

УДК 532.582.7:537.63:53.04

Б. Э. КАШЕВСКИЙ, А. М. ЖОЛУДЬ, С. Б. КАШЕВСКИЙ

ОДНОЧАСТИЧНАЯ И КОЛЛЕКТИВНАЯ МОДЫ МАГНИТНОЙ СЕПАРАЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ

(Представлено академиком О. Г. Пенязьковым)

Институт тепло-и массообмена им. А. В. Лыкова НАН Беларуси, Минск

Поступило 04.03.2015

Введение. Прямая магнитная сепарация слабомагнитных микрочастиц, особенно биологических частиц, основанная на их различии по магнитным свойствам, имеет давнюю историю [1–3], а в последние годы привлекла большой интерес [4–9] в связи с развитием микрожидкостных диагностических систем, для которых она подходит гораздо больше, чем традиционные методы центрифугирования и проточной цитометрии. Основным объектом этих исследований служит кровь, широко используемая в диагностике и известная значительным для биологических объектов различием магнитной восприимчивости лимфоцитов и деоксигенированных эритроцитов. Магнитная сила, которая может быть приложена к эритроцитам в микрожидкостных устройствах, хотя существенно превышает гравитационную силу, все же невелика. Это обстоятельство определило направленность текущих исследований на поиск эффективных магнитных схем сепарации. Теоретическую основу этих исследований составляет моделирование движения отдельных частиц. Вопрос о коллективном поведении увлекаемых магнитным полем клеток до сих пор не поднимался и представляет, по нашему мнению, значительный научный и практический интерес. Рассматривая возможные механизмы коллективного магнитофореза, мы можем сразу исключить из-за малой величины ($\sim 10^{-6}$) магнитной восприимчивости клеток и физиологических растворов, как локальные (межчастичные), так и глобальные (связанные с искажением внешнего магнитного поля исследуемым объектом) магнитные взаимодействия. Это наблюдение указывает на аналогию между протекающей в заданном силовом поле магнитной сепарацией слабомагнитных микрочастиц и гравитационной седиментацией, коллективный характер которой имеет гидродинамическую природу и составляет давнишнюю проблему механики жидкости и статистической физики [10–12]. Чтобы подчеркнуть это обстоятельство, можно говорить о магнитной сепарации слабомагнитных микрочастиц как о магнитной седиментации. В этом свете становится очевидным, что локальные (межчастичные) и глобальные (между жидкой и дисперсной фазами) гидродинамические взаимодействия представляют для магнитной сепарации фундаментальный интерес, подобно гравитационной седиментации с ее актуальными проблемами гидродинамических флуктуаций [13] и гранулярной неустойчивости Рэлея–Тейлора [14], которая может кардинально изменить ход и результат процесса сепарации. С другой стороны, возможность контролировать силовое поле привносит в классическую проблему седиментации новую интригу. В данной работе, используя разбавленную до различных концентраций цельную деоксигенированную кровь, мы изучаем особенности магнито-гравитационной седиментации в квази-двумерной микрожидкостной системе, обеспечивающей модельные условия осуществления и прямое наблюдение процесса.

Материалы и методы исследования. В работе использован экспериментальный комплекс [15], изначально предназначенный для определения магнитной восприимчивости клеток путем регистрации и обработки траекторий их движения в сильно разбавленной клеточной суспензии, помещенной в плоскую щелевую ячейку, при воздействии скрещенных в плоскости ячейки полей гравитационной и магнитной сил. Схема ячейки представлена на рис. 1, *a*. Высота ячейки

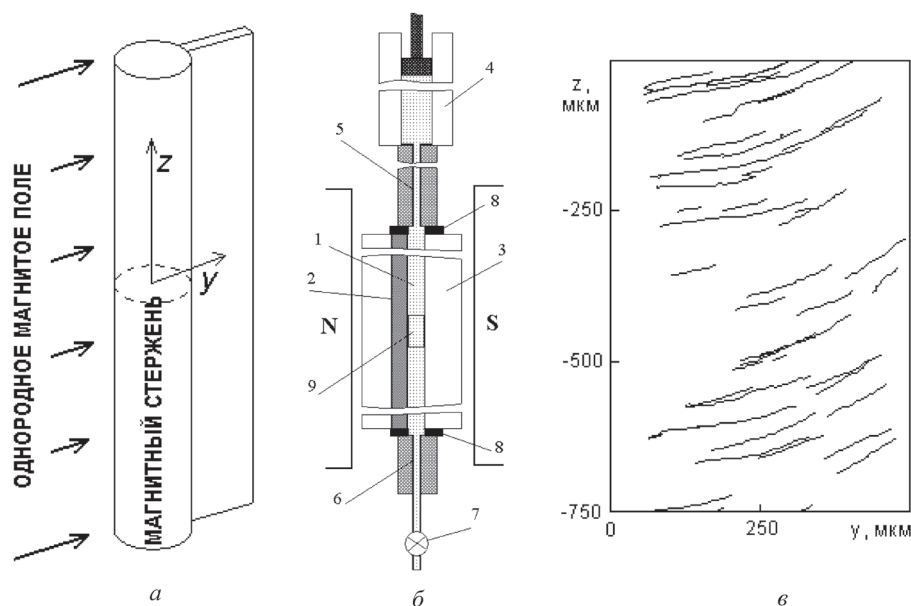


Рис. 1. Схема измерительной ячейки (а); схема микрогидравлической системы (б) и траектории магнитофореза эритроцитов в сильно разбавленной крови (в, образец S1,5): 1 – канал измерительной ячейки; 2 – магнитный стержень; 3 – стеклянный корпус ячейки; 4 – микрошприц; 5 – игла микрошприца; 6 – выводной канал; 7 – механический затвор; 8 – уплотнения; 9 – область наблюдения

(20 мм) много больше ширины (0,96 мм), которая, в свою очередь, много больше глубины (0,12 мм). Высокоградиентное магнитное поле создается установленным вдоль одного из вертикальных краев ячейки цилиндрическим ферромагнитным стержнем, намагничиваемым (до намагниченности $I = 1210$ Гс) однородным горизонтальным магнитным полем с напряженностью $H_0 = 9600$ Э, приложенным в плоскости канала. Диаметр магнитного стержня (1 мм) гораздо больше глубины канала. В этих условиях в расположенной в центральной (по высоте) части канала области наблюдения магнитное поле практически не изменяется по глубине и высоте канала, а его зависимость от поперечной координаты y (рис. 1, а) имеет простую аналитическую форму [15], что делает данную модель удобной для экспериментального и теоретического исследования.

Использованный для видеорегистрации процесса цифровой микроскоп с размером пикселя $2,55 \times 2,55$ мкм позволяет четко регистрировать эритроциты и лимфоциты, и дает тени тромбоцитов. Схема микрогидравлической системы, формирующей измерительный канал и обеспечивающей доставку в него исследуемой клеточной суспензии, представлена на рис. 1, б. Образец суспензии подается вручную с помощью герметично устанавливаемого микрошприца объемом 100 мкл. Выход жидкостного канала перед регистрацией запирается механическим затвором, что обеспечивает неподвижность исследуемого образца суспензии как целого. Эксперименты выполнены с суспензиями взятой из пальца одного из авторов крови, разбавленной аптечным соевым раствором с добавкой 2 % альбумина, и подвергшейся деоксигенации путем 40-минутного обдува азотом в закупоренном и слегка покачиваемом пенициллиновом флаконе. Согласно нормальному составу крови, эритроциты составляют подавляющее число клеток в образцах, доля лимфоцитов порядка 10^{-6} . Цифровая концентрация клеток в образцах, n , составляла 1,5; 3; 6; 12; 24; 48; 100 и 250 тыс/мкл. Соответствующая объемная концентрация c , оцененная из соотношения $c = nV$, где $V = 9 \cdot 10^{-8}$ мм³ – средний объем эритроцита, лежит в диапазоне от 0,00014 до 0,023. В неразбавленной крови $n \approx 5 \cdot 10^6$ мм⁻³, $c \approx 0,45$. Образцы с различной концентрацией обозначаем символом S_n , где n определяет числовую концентрацию клеток (в тыс/мм³). Программное обеспечение комплекса [15] позволяет детально обрабатывать движение клеток только в очень разбавленных образцах (с концентрацией до $n = 6 \cdot 10^3$ мм⁻³). Для иллюстрации процесса магнито-гравитационной седиментации в более концентрированных суспензиях использованы мгновенные снимки состояния системы в различные моменты времени, а также отображения движения в форме коротких треков клеток, полученных путем обработки исходных видеозапи-

сей, включающей преобразование изображения в серое, затем в черно-белое по подобранному порогу яркости, разделяющему точки фона (присваивается интенсивность 0) и точки клеток (присваивается интенсивность 1), и наконец, наложение нескольких следующих друг за другом (с интервалом 1 с) кадров.

Континуальная модель магнито-гравитационной седиментации в ячейке Хеле–Шоу.

В данном, самом первом, исследовании в основном рассматривается общий характер поведения системы, определяющий процесс магнитной сепарации эритроцитов, хотя мезоскопические явления, обусловленные гидродинамическими взаимодействиями движущихся в жидкости клеток, могут играть важную роль в формировании этого поведения. Отвечающую данной задаче теоретическую базу исследования составляет гидродинамическая модель клеточной суспензии как двухфазного континуума с известными физическими свойствами компонентов (ρ_0, ρ и χ_0, χ – плотность и магнитная восприимчивость соответственно жидкости и клеток, η_0 – вязкость жидкости), и с заданной начальной концентрацией клеток c_0 . Для описания седиментации используем локальные макроскопические характеристики дисперсной фазы (концентрация c и скорость \mathbf{w} клеток) и суспензии как целого (плотность $c\rho + (1-c)\rho_0$, магнитная восприимчивость $c\chi + (1-c)\chi_0$, массовая скорость \mathbf{u} , эффективная вязкость η , гидродинамическое давление P). Согласно электродинамике сплошных сред [16], неоднородное магнитное поле оказывает на клетки и жидкость силовое воздействие, описываемое плотностью силы $\chi\nabla(\mathbf{H}^2/2)$ и $\chi_0\nabla(\mathbf{H}^2/2)$ соответственно. В неподвижной жидкости объемная магнитная сила компенсируется дополнительным градиентом давления, который создает на клетках дополнительную (магнитную) силу Архимеда, $-V\chi_0\nabla(\mathbf{H}^2/2)$. Далее, следуя обычному для течений в щелевых ячейках типа Хеле–Шоу подходу [17], рассматриваем течение суспензии как эффективно двумерное с локальным профилем Пуазейля, и приходим к следующему выражению для усредненной по глубине канала скорости течения:

$$\mathbf{u} = \frac{h^2}{12\eta_s} \left(-\nabla P + [\rho_0 + c\Delta\rho]\mathbf{g} + \frac{1}{2}[\chi_0 + c\Delta\chi]\nabla H^2 \right).$$

Исключая в этом соотношении гидростатическую составляющую давления в стационарной жидкости без клеток $P_0 = \text{const} + \rho_0\mathbf{r}\mathbf{g} + \chi_0 H^2/2$, имеем ($p = P - P_0$)

$$\mathbf{u} = \frac{h^2}{12\eta_{\text{eff}}} \left(-\nabla p + c\Delta\rho\mathbf{g} + \frac{1}{2}c\Delta\chi\nabla H^2 \right) \quad (\Delta\rho = \rho - \rho_0, \quad \Delta\chi = \chi - \chi_0). \quad (1)$$

Для двумерной скорости клеток, движимых силой тяжести и магнитной силой, с учетом магнитной и гравитационной сил Архимеда запишем уравнение

$$\mathbf{w} = \mathbf{u} + \beta(c) \left[\Delta\rho\mathbf{g} + \frac{1}{2}\Delta\chi\nabla H^2 \right]. \quad (2)$$

Здесь $\beta(c)$ – макроскопическая подвижность, которую можно представить в форме широко используемого эмпирического соотношения $\beta(c) = (1-c)^k \beta_0$ с $k \approx 4,7$ [18]. Коэффициент β_0 представляет подвижность отдельной клетки и оценивается подвижностью сферы, $\beta_0 = d^2/18\eta_0$, с эквивалентным диаметром $d = (6V/\pi)^{1/3}$. Полная система уравнений включает также уравнения, отражающие закон сохранения массы для суспензии и клеток

$$\nabla\mathbf{u} = 0, \quad \frac{\partial c}{\partial t} + \nabla(c\mathbf{w}) = 0. \quad (3)$$

Заметим, что уравнение (2) записано в предположении, что все клетки имеют одинаковую плотность и магнитную восприимчивость. Кроме того, коэффициент подвижности β_0 в случае эритроцитов, имеющих форму двояковогнутых дисков, предполагает усреднение по случайным ориентациям клеток. Рассматривая движение в центральной (по высоте) части частиц канала, отметим существование простого (базового) динамического состояния системы, в котором процесс магнито-гравитационной седиментации протекает равномерно по высоте ($c = c(y, t)$), по-

перечное (вдоль y) макроскопическое движение суспензии отсутствует, но имеется вертикальное движение суспензии как целого с нулевым расходом, вызываемое изменяющимся во времени распределением концентрации клеток (и, следовательно, плотности суспензии) по ширине канала. Для этого состояния, в системе координат рис. 1, a , уравнения (1)–(3) сводятся к виду

$$u_y = 0, \quad u_z = (h^2 \Delta \rho g / 12 \eta_s)(\bar{c} - c), \quad p = \text{const} - \Delta \rho g \bar{c} z + (1/2)c \Delta \chi H^2, \quad (4)$$

$$w_z = u_z - \Delta \rho g \beta_0 (1 - c)^n, \quad w_y = \frac{1}{2} \beta_0 \Delta \chi (1 - c)^k \frac{dH^2}{dy}, \quad (5)$$

$$\frac{\partial c}{\partial t} + \frac{\partial}{\partial y}(c w_y) = 0. \quad (6)$$

Следует отметить, что эти уравнения, как и уравнения (1)–(3), не описывают седиментационный слой клеток, формирующийся на прилегающей к магнитному стержню стенке канала. Клетки просто исчезают из объема, а величина \bar{c} в (4) представляет среднюю концентрацию оставшихся клеток. Магнитное силовое поле в (5) дается в случае рассматриваемой ячейки соотношением [15]

$$\frac{1}{2} \frac{dH^2}{dy} \equiv f = -\frac{4\pi H_0 I}{R} \left[\left(\frac{R}{y} \right)^3 + \frac{2\pi I}{H_0} \left(\frac{R}{y} \right)^5 \right] \quad (y \geq R).$$

Для разбавленной суспензии ($\beta(c) = \beta_0$, $\eta = \eta_0$) из (6) находим основную характеристику процесса сепарации – время T полного извлечения клеток из объема жидкости, равное времени перемещения клеток между боковыми стенками канала. В общем случае (любой знак $\Delta \chi$) имеем

$$T = \int_{y_1}^{y_2} \frac{1}{|w_y(y)|} dy = K \left(\frac{y_2}{R} \right) - K \left(\frac{y_1}{R} \right), \quad K(\zeta) = \frac{R^2}{4\pi H_0 I \beta_0 |\Delta \chi|} \left[\frac{\zeta^4}{4} - \frac{Q \zeta^2}{2} + \frac{Q^2}{2} \ln \left(\frac{\zeta^2}{Q} + 1 \right) \right].$$

Здесь y_1 и y_2 – расстояние от оси магнитного стержня до соответственно ближней и дальней стенок канала, $Q = 2\pi I / H_0$.

Результаты и их обсуждение. Прежде всего, путем компьютерной обработки траекторий движения клеток в сильно разбавленной суспензии (образец S1,5; рис. 1, e) оцениваем характеристики клеток, определяющие, согласно сформулированной модели, процесс магнито-гравитационной седиментации. Из измеренной величины средней вертикальной скорости клеток, $w_z = -1,53$ мкм/с, принимая для их плотности значение $\rho = 1,09$ г/см³ [19] и измеренное значение плотности жидкости $\rho_0 = 1,005$ г/см³ ($\Delta \rho = 0,085$ г/см³), находим среднюю гидродинамическую подвижность клеток $\beta_0 = |w_z| / g \Delta \rho = 1,834 \cdot 10^{-6}$ с · см³/г. Используя метод обработки траекторий в поле [15], находим среднюю относительную удельную восприимчивость клеток $k = \Delta \chi / \Delta \rho = 2,1 \cdot 10^{-6}$ см³/г, что, с учетом указанного выше значения $\Delta \rho$, дает среднюю относительную магнитную восприимчивость эритроцитов $\Delta \chi = 1,79 \cdot 10^{-7}$. Путем программной обработки данных видеорегистрации движения клеток, которая возможна до концентрации $n = 6 \cdot 10^3$ мм⁻³, найдено изменяющееся во времени распределение клеток по ширине канала, которое согласуется с результатами численного решения уравнения (6), полученного с учетом параметров ячейки и найденных значений β_0 и $\Delta \chi$. Опуская здесь детали этого исследования, отметим, что по прошествии времени, равного вычисленному из (6) времени полной сепарации $T = 13,5$ мин в канале остаются единичные клетки, присутствие которых объясняется дисперсией свойств клеток относительно средних значений [20].

В целом картина процесса сепарации согласуется с теорией базового состояния только в очень разбавленных суспензиях (до $n = 12 \cdot 10^3$ мм⁻³, $c = 0,0011$). Магнито-гравитационная седиментация начинается с относительно быстрого обеднения клетками области канала, прилегающей к магнитному стержню, следствием чего является резкая стратификация концентрации клеток (рис. 2). Первые явные отклонения от базового состояния (рис. 2) наблюдаются уже при весьма малой концентрации (образец S24, $c = 0,0022$) и характеризуются возникновением крупномасштабных квазипериодических по высоте канала гранулярных структур.

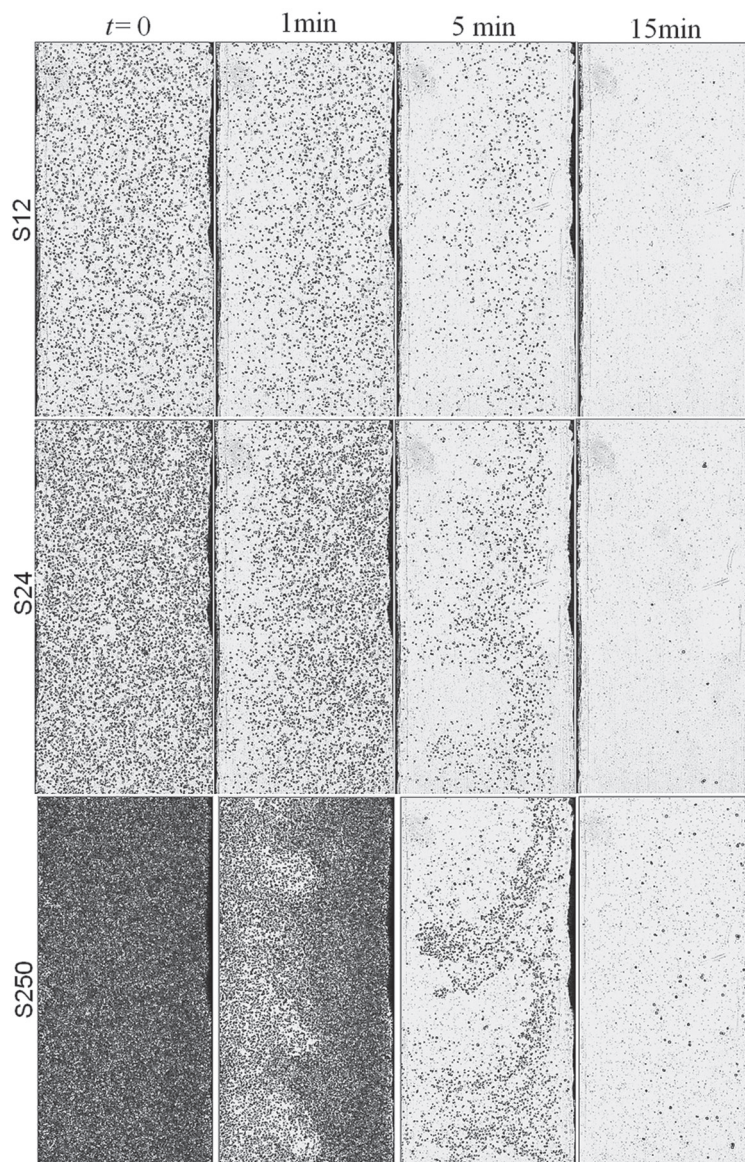


Рис. 2. Мгновенные снимки, полученные для образцов с различной концентрацией клеток (S12, S24 и S250) до наложения магнитного поля ($t = 0$) и через 1, 5 и 15 мин магнитной сепарации

Рассматривая отображения треков клеток в этом образце (рис. 3, б, в) можно видеть глобальное вертикальное движение суспензии и ускоренное (относительно разбавленной суспензии, рис. 3, а) горизонтальное движение клеток в областях с увеличенной концентрацией. Это указывает на зарождение вихревого течения, которое увлекает к магнитному стержню более концентрированную суспензию из отдаленных областей канала и возвращает в обратном направлении суспензию, обедненную клетками, подвергшимися интенсивному притяжению в прилегающей к магнитному стержню области канала. Следует обратить внимание на тот факт, что данной глобальной перестройке состояния системы, которое можно определить как магнитофоретическую гранулярную неустойчивость Релея–Тейлора, предшествует возникновение неупорядоченной «пятнистой» системы мезоскопических неоднородностей полей скорости и концентрации (рис. 3, б). Интенсивность гидродинамического движения возрастает с увеличением концентрации (рис. 3, г, д), приводя к запутанной вихревой структуре, в которой скорость течения намного превосходит скорость магнитофореза клеток в разбавленной суспензии (рис. 3, е–з; образец S250; $c = 0,023$).

Важный результат исследования состоит в том, что наблюдаемое интенсивное перемешивание суспензии практически не влияет на полное время магнитной сепарации. Об этом свиде-

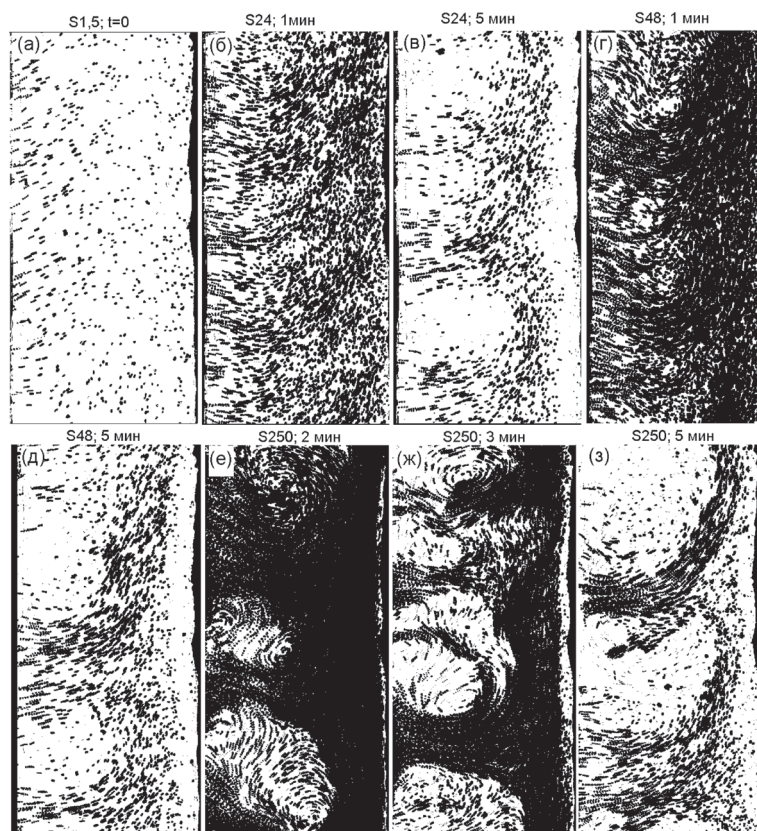


Рис. 3. Треки движения клеток за 3 с в образцах с различной концентрацией в различные моменты времени после начала магнитной сепарации

тельствуют снимки суспензий с разной концентрацией (рис. 2), полученные после 15-минутной сепарации, на которых видны единичные оставшиеся в канале клетки. Эти клетки, движущиеся в противоположном направлении, являются лимфоцитами. Их прямой подсчет дает числа, пропорциональные начальной цифровой концентрации суспензии, что свидетельствует о том, что гидродинамическое увлечение лимфоцитов эритроцитами не влияет на чистоту сепарации эритроцитов. Фундаментальное значение имеет вопрос о характере (пороговый или беспороговый) обнаруженной неустойчивости. Заметим, что ее первые признаки наблюдаются в образце S24, в котором среднее расстояние между клетками, $n^{-1/3} \approx 35$ мкм, лишь в три раза меньше глубины ячейки, что ставит под сомнение саму возможность макроскопического описания этого явления. На мезоскопическом уровне рассмотренное основное состояние с отсутствующим горизонтальным движением суспензии как целого (следовательно, с равномерным по высоте течением жидкости навстречу движущимся клеткам) нарушается из-за дисперсии концентрации клеток. Скорее всего, зарождение глобальной неустойчивости обусловлено взаимодействием между локальными течениями и его детальное исследование возможно только на основе микрогидродинамической теории.

Заключение. Впервые поставлен вопрос о коллективном характере магнитофореза слабомагнитных микрочастиц при их высокоградиентной магнитной сепарации из жидкости. Сформулирована концепция магнито-гравитационной аналогии, позволяющая рассматривать коллективный магнитофорез как коллективную седиментацию в заданном силовом поле, построена континуальная модель магнито-гравитационной седиментации в ячейке Хеле–Шоу. Предложена экспериментальная модель для ее изучения, обеспечивающая достаточно простые и хорошо детерминированные условия осуществления эксперимента, измерение определяющих процесс физических свойств частиц и, в сильно разбавленных суспензиях, регистрацию пространственно-временных характеристик их распределения, а также визуализацию процесса в суспензиях с увеличенной (до нескольких процентов) объемной концентрацией. Изучен процесс сепарации

эритроцитов из разбавленной деоксигенированной цельной крови. Установлено, что одночастичная мода сепарации сменяется коллективной уже при объемной концентрации клеток около 0,002. Дальнейшее увеличение концентрации сопровождается интенсификацией вихревого движения суспензии, что, однако, не оказывает в изученном диапазоне объемных концентраций до $c = 0,023$ заметного влияния на время полной сепарации эритроцитов и на ее чистоту. На основе визуализации индивидуального поведения клеток сделан вывод о связи гидродинамической неустойчивости суспензии при магнитной сепарации с мезоскопическими вихревыми структурами, обусловленными пространственной дисперсией концентрации клеток. Разработанный метод исследования и полученные результаты представляют интерес для технологии микрожидкостных диагностических систем, для механики суспензий в целом.

Литература

1. *Melville D. et al* // Nature. 1975. Vol. 255. P. 706.
2. *Owen C. S.* // Biophys. J. 1978. Vol. 22. P. 171.
3. *Paul F. et al.* // Lancet. 1981. Vol. 2. P. 70.
4. *Furlani E. P.* // J. Phys. D: Appl. Phys. 2007. Vol. 40. P. 1313.
5. *Jung J., Han K.* // Appl. Phys. Lett. 2008. Vol. 93. Art. N 223902.
6. *Gossett D. R. et al.* // Analyt. Bioanalyt. Chemistry. 2010. Vol. 379. P. 3249.
7. *Jung Y. et al.* // Biomedical Microdevices. 2010. Vol. 12. P. 637.
8. *Moore L. R. et al.* // IEEE Trans. on Magnetics. 2013. Vol. 49. P. 309.
9. *Nam J. et al.* // Anal. Chem. 2013. Vol. 85. P. 7316.
10. *Batchelor G. K.* // J. Fluid. Mech. 1972. Vol. 56. P. 375.
11. *Ramaswamy S.* // Advances in Physics. 2001. Vol. 50. P. 297.
12. *Guazzelli É., Hinch J.* // Annual Review of Fluid Mechanics. 2011. Vol. 43. P. 97.
13. *Tee S.-Y. et al.* // Phys. Rev. Lett. 2002. Vol. 89. Art. N 054501.
14. *Desreumaux N. et al.* // Phys. Rev. Lett. 2013. Vol. 111. Art. N 118301.
15. *Kashevsky B. E., Zholid A. M., Kashevsky S. B.* // Rev. Sci. Instrum. 2012. Vol. 83. Art. N 075104.
16. *Ландау Л. Д., Лифшиц Е. М.* Электродинамика сплошных сред. М., 1982.
17. *Bensimon D. et al.* // Rev. Modern Phys. 1986. Vol. 58. P. 977.
18. *Richardson J. F., Zaki W. N.* // Trans. Inst. Chem. Eng. 1954. Vol. 32. P. 35.
19. Cell Separation Methods and Selected Applications / eds. by T. G. Pretlow, T. Pretlow. San Diego: Acad. Press, 1983. P. 33.
20. *Кашевский Б. Э. и др.* // Докл. НАН Беларуси. 2015. Т. 59, № 1. С. 58–62.

B. E. KASHEVSKY, A. M. ZHOLID, S. B. KASHEVSKY

bekas@itmo.by

SINGLE-PARTICLE AND COLLECTIVE MODES IN MAGNETIC SEPARATION OF RED BLOOD CELLS

Summary

An experimental microfluidic model is proposed for studying magnetophoretic separation of submagnetic microparticles from liquid that ensures simple deterministic experimental conditions, the possibility of measuring the relevant physical properties of microparticles, their spatio-temporal distribution in diluted samples, and the process visualization in concentrated samples. Magnetic separation of red blood cells from deoxygenated diluted blood is studied. A phenomenon is discovered of the magnetophoretic granular Rayleigh–Taylor type instability that destroys the single-particle separation mode at cell volume concentration of about 0.002. The cell concentration growth is accompanied by enhancing the suspension vortex motion, but however this does not influence the time and the purity of the magnetic separation of red blood cells. From our observations, we have come to the conclusion that the hydrodynamic magnetophoretic instability should be related with mesoscopic swirls caused by the cell concentration dispersion. The concept of the magneto-gravitational analogy is formulated allowing one to consider the collective magnetophoresis of submagnetic microparticles as sedimentation in predetermined force fields. Our experimental model and the results obtained are of interest for the emerging technology of microfluidic analytical systems and for mechanics of suspensions as a whole.